



TITLE:

# 蛋白質の水和自由エネルギーの計算(<特集>若手による溶液化学の新展開)

AUTHOR(S):

入佐, 正幸

---

CITATION:

入佐, 正幸. 蛋白質の水和自由エネルギーの計算(<特集>若手による溶液化学の新展開). 物性研究 1997, 68(4): 416-433

ISSUE DATE:

1997-07-20

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/96082>

RIGHT:

## 蛋白質の水和自由エネルギーの計算

九州工業大学・情報工学部 入佐 正幸

## 1. はじめに

蛋白質は核酸とともに生命活動において主役を演ずる分子である。蛋白質は20種類のアミノ酸からなり、触媒機能を持つ生体高分子として定義される。蛋白質の特徴の一つは、水中で一つの立体構造（天然構造）を取ることである。アンフィンゼンの実験により[1]、この天然構造は熱力学的に安定な状態であることが知られている。つまり、熱を加えたりして蛋白質の構造が変成しても、生体内の条件に戻せば天然構造に巻き戻るのである。アミノ酸の配列（1次構造）から天然構造を予測する問題を、「3次元構造予測」と言う。水中で任意の構造の蛋白質の自由エネルギーが計算できれば、原理的には自由エネルギーが最小になる構造を求めることにより3次元構造予測は解決する。しかし、コンピューターの性能の進歩が著しい今日でも成功した例はない。その理由の一つに、自由エネルギーへの水からの寄与である水和自由エネルギーの計算が難しいことがあげられる。ここでは、蛋白質の水和自由エネルギーを溶液論を使って計算する試みについて述べる。

蛋白質は小さな蛋白質でも重原子数が数百個程度になるため、蛋白質を取り囲んでいる水分子のとりうる構造は多岐にわたり、熱力学平均量である水和自由エネルギーを計算によって求めることは非常に困難である。そのため蛋白質研究の分野では、蛋白質内の各原子の露出表面積を利用した経験的手法が広く使われている[2,3]。この経験的手法では、水和自由エネルギー  $\bar{g}_h$  が各原子からの寄与の和で表されると仮定し、

$$\bar{g}_h = \sum_i \alpha_i^h A_i \quad (1)$$

を使って計算する。ここで  $A_i$  と  $\alpha_i^h$  はそれぞれ、溶質内の原子  $i$  の露出表面積と、低分子での実験によって推測された比例係数である。この手法は、アミノ酸置換した蛋白質の安定性に関する議論において、疎水水和の寄与を精度よく与える手法として知られている。しかし、色々な寄与からなる水和自由エネルギーを、蛋白質の構造が議論できる程度まで正確に計算したい場合や、温度、圧力、塩濃度等の条件を変化した場合の水和自由エネルギーの変化量が予測できるようにしたい場合は、蛋白質の水和自由エネルギーを理論的に計算する事が求められる。本文では我々が提案している水和自由エネルギーの計算方法である、拡張された scaled particle 理論（拡張 SPT）[4,5]を紹介する。

## 2. 水和自由エネルギーの定義

水和自由エネルギーは、溶質分子1個を気相中のある位置から水中のある位置へ移動させた

きの、化学エネルギーの変化量（移相エネルギー）として定義される（図1）。ただし、気相および水中での溶質分子の外部運動の寄与は考えない。つまり、水和自由エネルギーの定義では、空間的な自由度は切り離して考える。水和自由エネルギー、 $g_h$ 、は厳密には以下の式で定義される[6]。

$$\begin{aligned}\mu_s &= \mu_s^{\text{ideal}} + \mu_s^{\text{excess}} \\ \mu_s^{\text{ideal}} &= N_A k_B T \left( \frac{\partial}{\partial N_s} (\ln \rho_s + \ln \Lambda_s^3 - 1) \right)_{V, T} \\ \bar{g}_h &= \mu_s^{\text{excess}}\end{aligned} \quad (2)$$

ここで、 $N_s$ ,  $\rho_s$ 、そして  $\Lambda_s$  はそれぞれ、溶質の分子数、数密度、そしてドブロイの熱波長である。

$\mu_s$  は水中での溶質の化学ポテンシャルであり、 $\mu_s^{\text{ideal}}$  と  $\mu_s^{\text{excess}}$  はそれぞれ溶質のアイデアル項（外部運動からの寄与）とイクセス項である。このイクセス項が水和自由エネルギーに当たる。ただし、アボガドロ数 ( $N_A$ ) 倍にされていることからわかるように、水和自由エネルギーの実際の取り扱いでは単位をモルにする。

### 3. 方法

溶液化学の分野で低分子の水和自由エネルギーを求める際に広く用いられてきた手法に、scaled particle 理論 (SPT) がある[7,8]。SPT による水和自由エネルギー ( $\bar{g}_h$ ) は、次のような思考実験をとおして計算される（図2）。水和自由エネルギーは、(I) 水中に空洞を作るための仕事;  $\bar{g}_c$ , (II) 溶質と水の間の Lennard-Jones タイプの引力による寄与;  $\bar{g}_l$ , (III) 静電相互作用による寄与;  $\bar{g}_B$  の和、

$$\bar{g}_h = \bar{g}_c + \bar{g}_l + \bar{g}_B \quad (3)$$

として考える。疎水水和としての寄与は、 $\bar{g}_c + \bar{g}_l$  にあたり、親水水和としての寄与は、 $\bar{g}_B$  にあたる。

#### a. 水中に空洞を作るための仕事

これらの成分の内  $\bar{g}_c$  は、水分子を剛体球だと見なすことにより、水と同じ数密度を持った剛体球

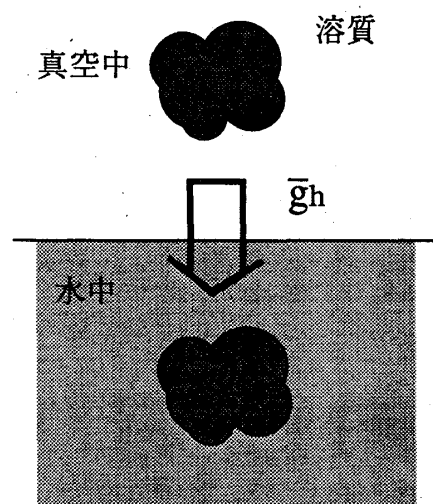


図1 水和自由エネルギー

系に空洞を作る仕事<sup>1</sup>を計算することによって計算することができる[8,9,10]。水分子に対応する剛体球の半径の値をどうするかは後ほど説明する。具体的には  $\bar{g}_c$  を次の式で計算する[11,12]。

$$\bar{g}_c = A + B + \frac{1}{2} C + P V_c(1) \quad (4)$$

$$\begin{aligned} A &= -k_B T \ln(1 - \rho V_c(0)) \quad , \quad B = k_B T \frac{1}{1 - \rho V_c(0)} \rho \left( \frac{\partial V_c}{\partial \lambda} \right)_{\lambda=0} \quad , \\ C &= k_B T \frac{1}{1 - \rho V_c(0)} \rho \left( \frac{\partial^2 V_c}{\partial \lambda^2} \right)_{\lambda=0} + k_B T \frac{1}{(1 - \rho V_c(0))^2} \rho^2 \left( \left( \frac{\partial V_c}{\partial \lambda} \right)_{\lambda=0} \right)^2 \quad , \end{aligned} \quad (5)$$

で表される。 $V_c(\lambda)$  は、 $\lambda$  倍にスケールしたときの溶質の排除体積、 $P$  は系の圧力、 $k_B$  は Boltzmann constant,  $T$  は絶対温度、 $\rho$  は水の数密度である。 $V_c(0)$  は溶媒 1 分子の体積になる。式(5) は、水中にあける空洞の大きさを仮想的に変えることにより導出された式である。溶質分子をスケールすることによって空洞の大きさを変化させる。溶質分子が質点の時および空洞の大きさがそれよりも小さいときは、統計力学的手法により厳密な式が知られている。溶質分子がマクロな大きさを持つときは、熱力学により厳密な式が知られている。この両者を満たすことを条件として上記の式は導出できる。

拡張 SPT では、スケールされた溶質の排除体積  $V_c(\lambda)$  を、球の半径と球の中心間の距離を次のように設定することによって、重なり合った球の体積として求めている[13]。

$$R_a = r_a \lambda + r_v \quad , \quad D_{ab} = d_{ab} \lambda \quad (6)$$

ここで  $r_a$  と  $r_v$  はそれぞれ溶質分子内の原子  $a$  と水の半径である。 $d_{ab}$  は原子  $a$  と原子  $b$  の間の距離である。 $\lambda$  はスケーリングパラメーターである。拡張 SPT を実行するための鍵である、重なり合った球の解析的体積計算は付録に示す。

#### b. 溶質と水の間の Lennard-Jones タイプの引力による寄与

Lennard-Jones タイプの引力による寄与、 $\bar{g}_l$  は以下のようにして計算する。 $\bar{g}_l$  は、溶質と水との間の Lennard-Jones タイプの引力による相互作用からなる、エンタルピー  $\bar{h}_l$  に等しいと仮定す

<sup>1</sup> 剛体球系の状態方程式を初めて理論的に与えたのが SPT である。SPT が与える剛体球系の状態方程式と全く同じ方程式を、py 積分方程式の圧縮率方程式での解が与える事は有名である[6]。

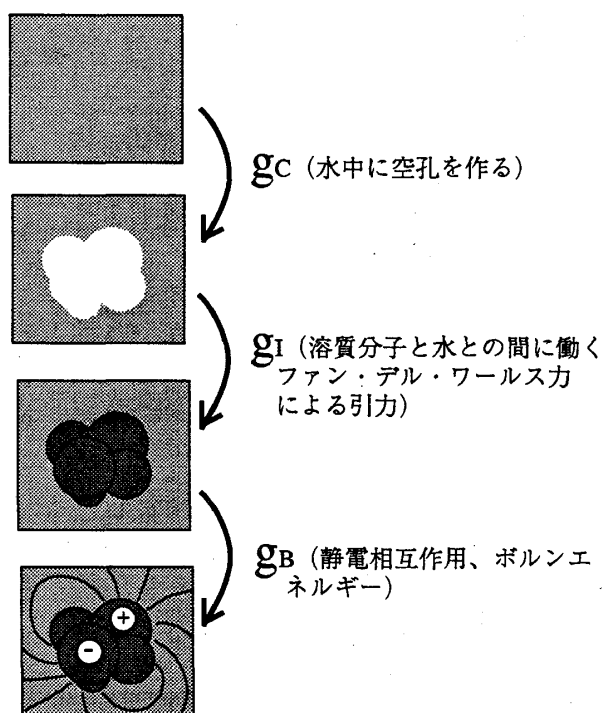


図 2 水和自由エネルギーの各成分

る[14]。  $\bar{h}_i$  は、溶質分子と水分子との間の Lennard-Jones タイプの引力による相互作用の総和として計算される。SPT では溶質分子をシングルサイト[14]として扱うが、拡張 SPT では分子をマルチサイトとして扱う[5]。次のステップ関数は、溶質分子のまわりの溶媒分子の分布関数として用いられる。

$$\begin{cases} \eta(x, y, z) = 0 & \dots (\exists b; l_{bv} \leq r_b + r_v) \\ \eta(x, y, z) = 1 & \dots (\forall b; l_{bv} > r_b + r_v) \end{cases} \quad (7)$$

ここで  $r_b$  は溶質内の原子  $b$  の半径である。 $(x_b, y_b, z_b)$  は原子  $b$  の中心位置のデカルト座標である。 $\bar{h}_i$  は以下の式によって計算される。このとき、溶媒分子の分布関数に  $\eta(x, y, z)$  を用いることにより、マルチサイトとして分子を扱うことができる。

$$\bar{h}_I = \sum_a \bar{h}_{Ia}, \quad \bar{h}_{Ia} = -C_a \iiint \rho \eta(x, y, z) \left( \frac{1}{l_{av}^6} - \frac{\sigma_{av}^6}{l_{av}^{12}} \right) dx dy dz \quad (8)$$

$$C_a = 4 (\epsilon_a \epsilon_v)^{1/2} \sigma_{av}^6, \quad \sigma_{av} = (\sigma_a + \sigma_v) / 2,$$

ここで  $\bar{h}_{Ia}$  は原子  $a$  からのエントロピーの寄与である。 $\epsilon_v$  と  $\sigma_v$  は水分子の Lennard-Jones パラメーター、 $\epsilon_a$  と  $\sigma_a$  は溶質内の原子  $a$  の Lennard-Jones パラメーターである。積分計算は3次元のグリッドを使った数値計算を行った。

後で述べることをために、ここで  $\bar{g}_c$  と  $\bar{g}_i$  の温度依存性について説明する。水和自由エネルギーのうち疎水水和の寄与の温度依存性は簡単に計算できる。SPT で使われるパラメーター中で、温度に影響されるは水の数密度のみである。水の数密度さえわかっているならば、任意の温度での  $\bar{g}_c$  と  $\bar{g}_i$  の値を計算することができる。水の数密度を温度に関する4次の多項式をとり、実験値を再現するようにフィットさせた。水分子に関する2つのパラメーター、 $\epsilon_v$  と  $\sigma_v$  は温度に依存せずすべての温度領域で使用できる。

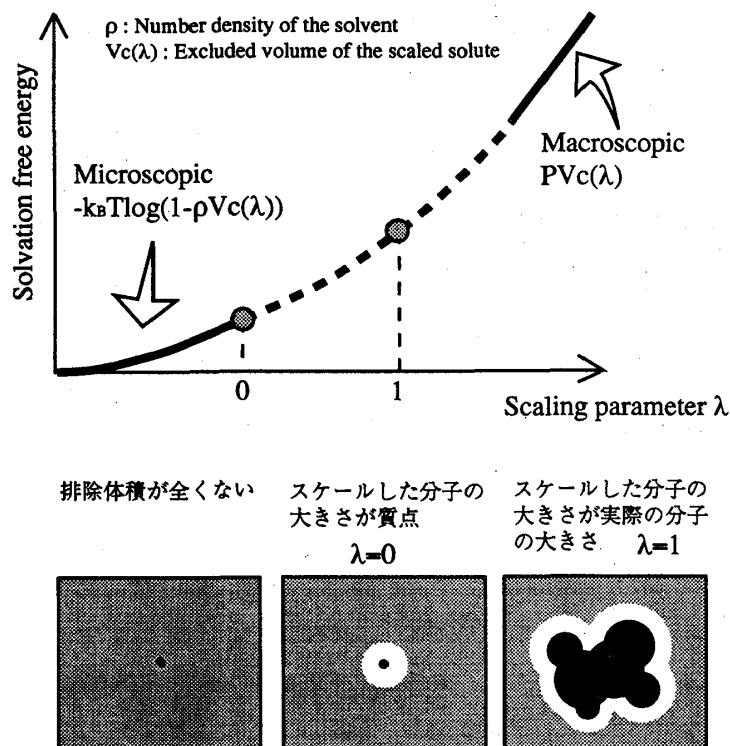


図 3 スケーリングパラメーター

## c. 静電相互作用による寄与

静電相互作用の水和自由エネルギーへの寄与（ボルンエネルギーと呼ばれる[15]）は、Poisson-Boltzmann 方程式を解くことによって求められる[16,17]。境界条件を整合性を考慮した差分法によって計算した[18,19]。この方法は水中の蛋白質に関する静電相互作用の計算で広く使われて来た。系を溶質の領域と溶媒の領域の2つに分けて考える。この時、溶質と溶媒の誘電率はそれぞれ1と78.4である。これら2つの誘電体の境界は、ちょうど溶質分子の表面に対応している（ただし、ヘテロ原子に結合している水素原子は除く。図4）。部分電荷を持つヘテロ原子に結合した水素原子の場合は、水素原子のもつ部分電荷が高い誘電率を持つ水に近づきすぎないように、水素原子の誘電体としての半径を  $1.0 \text{ \AA}$  とした[20]。我々が後に示す計算で用いた Poisson-Boltzmann 方程式を解くためのプログラムは、JCPE (Japan chemistry program exchange) に登録されている。

## d. エネルギーと構造のパラメーター

溶質中の水素原子は結合している重原子とともに1個の united atom として扱う。重なり合って溶質を形作る剛体球の半径  $r$  は、対応する united atom の Lennard-Jones パラメーターで

の直径  $\sigma$  の半分とする。Jorgensen が決定した、TIPS [21] と OPLS [22] のパラメーターをそれぞれ低分子（アルカンとアルコール）および蛋白質の united atom に用いる。アルカンとアルコールの計算に使った、(2) で用いる Lennard-Jones パラメーターと (3) で用いる部分電荷のパラメーターを表 1（ただしアルコールの計算に関するパラメーターのみ）に示す。水分子のパラメーターは、希ガスの水への溶解度の実験から Pierotti が決めたものである。水分子に対応する実効的な剛体球の半径は、 $1.375 \text{ \AA}$  であり蛋白質研究で水の半径として広く使われている  $1.4 \text{ \AA}$  とほとんど同じ値である[23]。低分子や蛋白質の構造のパラメーター（結合長、結合角）は、Jorgensen の論文と同じものを用いる。

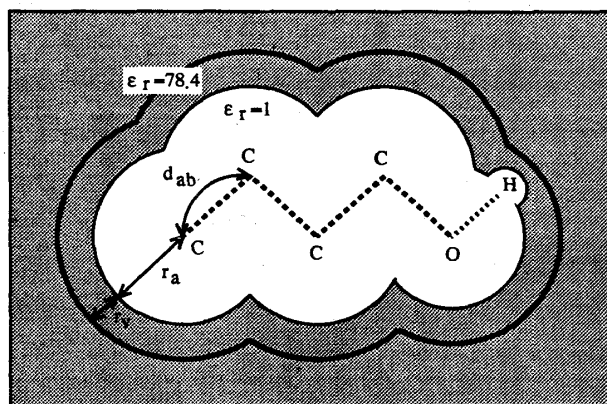


図 4 trans 構造のノーマルアルコールを剛体球の重なりとして表したモデル。排除体積の境界を太い実線で示す。溶媒分子の半径は  $r_v$  である。系を誘電体としたとき溶媒（水）に対応する部分をグレーで示す。

Compd	$\sigma, \text{\AA}$	$\epsilon/k_B, \text{K}$	q, electrons
H <sub>2</sub> O	2.75	85.3	0
CH <sub>4</sub>	3.73	148.0	0
CH <sub>3</sub>	3.86	91.2	*
CH <sub>2</sub>	3.98	57.5	*
O in ROH	3.08	88.0	-0.685
H in ROH	0	0	0.40

\* partial charges chosen to achieve neutrality of monomers in the same manner in TIPS.

表 1 Lennard-Jones parameters of water and extended atoms

#### 4. 結果

以下、Pierotti らによる SPT と我々による拡張 SPT の結果をを順に説明する。

##### a. SPT (Pierotti)

Pierotti により初めて、SPT の水和自由エネルギー計算への応用がなされた[8]。その際に水のバ

ラメーターを表1の値に設定すると、無極性低分子の水和自由エネルギーが驚くほど精度良く計算できることがわかった(表2)。また、Pierotti は水和に関する他の熱力学量(部分モルエントロピーと熱容量)の計算も行い、実験値と良く一致していることを確認した。この段階では、溶質分子の形は球とされた。溶質分子の形を球とすると以下ようになる。

i). (a) での  $V_c(\lambda)$  は、 $4/3\pi(\lambda r_s + r_v)$  となる。

ii). (b) での  $\bar{h}_{1a}$  は、

$$\bar{H}_I = -4\pi C_s \int_{r_s+r_b}^{\infty} \rho l_{sv}^2 \left( \frac{1}{l_{sv}^6} - \frac{\sigma_{sv}^6}{l_{sv}^{12}} \right) dl_{sv} \quad (9)$$

$$C_s = 4(\epsilon_s \epsilon_v)^{1/2} \sigma_{sv}^6, \quad \sigma_{sv} = (\sigma_s + \sigma_v)/2,$$

となる。この式は解析的に積分することができる。ただし、Pierotti らは溶質分子をシングルサイトの分子としてあつかったため、溶質分子  $s$  の Lennard-Jones パラメーター、 $\epsilon_s$  と  $\sigma_s$  を実験によって決めている。

溶質	$\bar{g}_h$ (計算), cal/mol	$\bar{g}_h$ (実験), cal/mol	溶質	$\bar{g}_h$ (計算), cal/mol	$\bar{g}_h$ (実験), cal/mol
He	6820	7040	N <sub>2</sub>	6590	6610
Ne	6530	6930	O <sub>2</sub>	6270	6310
Ar	6110	6270	CO	6750	6480
Kr	5700	5930	NO	5730	6060
Xe	5450	5600	CH <sub>4</sub>	6250	6250
Rn	5000	5130	CF <sub>4</sub>	7110	7400
H <sub>2</sub>	6550	6600	CCl <sub>4</sub>	4700	4350

表2 SPT による低分子の水和自由エネルギーの計算 (Pierotti, J.Phys.Chem. 69, 281(1965))

Pierotti の仕事の後、溶質の形として球以外の形も取り扱えるように SPT を拡張することが試みられた[11,12,13,24]。拡張の鍵となったのは  $V_c(\lambda)$  の解析的計算である。なぜなら、式(5)にみられるように、 $\lambda$ に関する2階までの微分係数が必要になるからである。溶質分子の形をなめらかな凸体<sup>2</sup>とした仕事がなされた[11,12]。しかし、溶質分子の形を重なり合った球としたものは、 $V_c(\lambda)$

<sup>2</sup> SPT を凸体での計算に拡張する場合でも、凸体の排除体積の解析的計算が鍵となった。凸体の排除体積の解析的計算については[F-1]を参照されたい。



の解析的な導出の数学的な難しさから議論されなかった。一方、イオンや極性分子に対してボルンエネルギーの計算が Poisson-Boltzmann 方程式を使っておこなわれた。しかし、部分電荷を用いて静電相互作用の計算をする場合は、任意の形の溶質分子を扱えない SPT と結びつけることは困難だった。それは、ボルンエネルギーが誘電体の境界の形に敏感であるため、静電相互作用の計算において誘電体の境界をなめらかな凸体に近似するすることができないからである。

## b. 拡張 SPT

### i. ブタンの構造異性体に関する水和自由エネルギー

ブタン ( $C_4H_{10}$ ) の水和自由エネルギーを計算した。結合長、結合角を固定するとブタンには 1 つの内部自由度 (二面角の回転) がある (図

5)。二面角を回転した際に生じるすべての構造について計算を行った (図 6)。ブタン内の各原子に、拡張 SPT で計算に使ったものと同じパラメーター (TIPS) を用いた、Jorgensen による分子動力学法による結果[25] も示す。分子動力学法の計算では、水分子をあらわに扱っている。 $\bar{g}_c$  の計算は解析的にできるため、すべての構造について正確な値が得られる。ブタンには部分電荷がないため、ボルンエネルギーは 0 となる。二面角が 0 度である cis 構造で、水和自由エネルギーが最小になり、130 度付近で最大となる。この 130

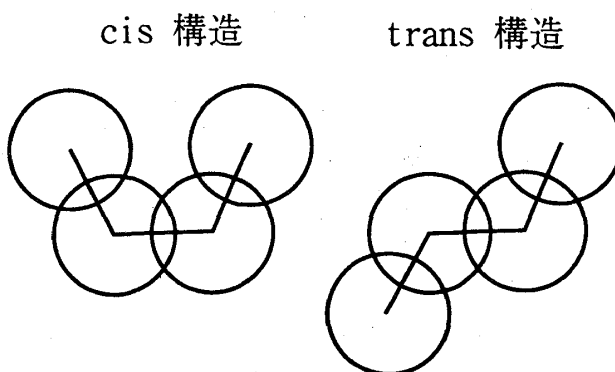


図 5

度付近での極大は、 $\bar{g}_c$  だけでは生じない。Lennard-Jones 力からの寄与である  $\bar{g}_l$  からの寄与があって初めて生じるものである。分子動力学法の結果と拡張 SPT の結果を比較すると、非常によく一致していることがわかる。

### i. アルカンの水和自由エネルギー

ノーマルアルカンの水和自由エネルギーの値を、分子中の炭素数を横軸として、図 7 に示す。ただし、分子の構造は trans 構造 (分子中のすべての二面角の値が 180 度) にして計算した。実験の解釈の違いから 2 種類の実験値が報告されているのでそれも示す。この解釈の違いは水和自由エネルギーの定義に関わっており、現在でも議論が続いている。溶解度の実験から水和自由エネルギーを導出するには以下の式を使う。

$$\Delta \bar{g}_s^o(g \rightarrow m) = -k_B T \ln \left( \frac{\rho_s^g}{\rho_s^m} \right) + \chi \quad (10)$$

ここで  $\rho_s^g$  と  $\rho_s^m$  はそれぞれ気相中と液体中での溶質の数密度である。式 (10) の 2 番目の項は、Sharp らによって提案された補正項である[26,27]。

この項は Flory-Huggins の格子理論[28,29]で現れる項と全く同じであり、

$$\chi = -k_B T \left( 1 - \frac{v_s}{v_v} \right) \quad (11)$$

で与えられる。ここで  $v_s$  と  $v_v$  はそれぞれ溶質  $s$  と溶媒  $v$  の部分モル体積である。この項が必要かどうかは議論が続いている。そのため、図 7 には両方の実験値を示した。メタン( $n=1$ )の計算は、メタンを剛体球とみなすときの半径が異なることを除けば、Pierotti が行った計算と全く同じである。拡張 SPT で計算された値は、2 つの実験値にとってもよく一致している。特に、Sharp の補正を行った実験値の方によくあっている。

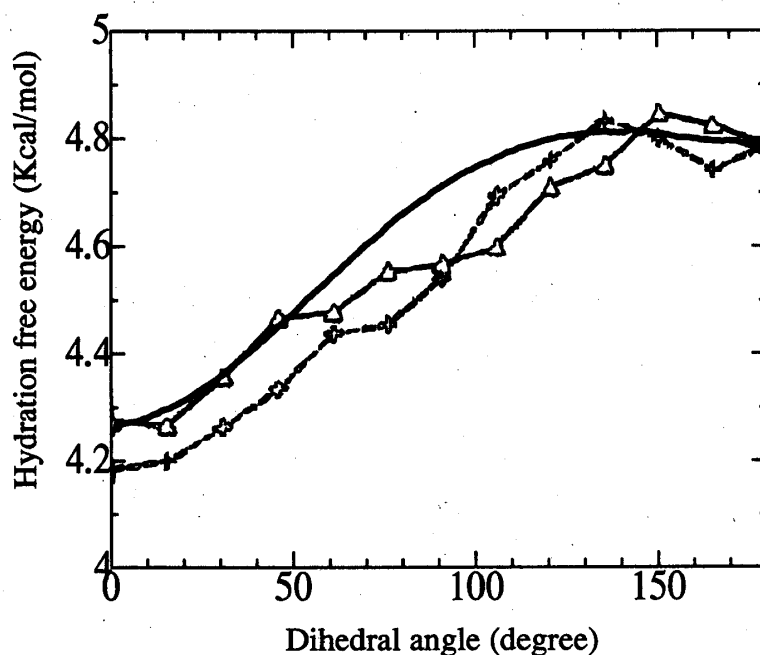


図 6 ブタンの水和自由エネルギー

横軸にブタンの二面角の値を、縦軸にブタン ( $C_4H_{10}$ ) の水和自由エネルギーを実線で示す。二面角が 0 度および 180 度のときそれぞれ、cis 構造および trans 構造に対応する。ブタン内の各原子に対して、拡張 scaled particle 理論での計算に使ったものと同じパラメーター (TIPS) を使った Jorgensen による分子動力学法による結果[23]も破線 ( $\Delta$ と+の 2 つのデータ) で示す。ただし、分子動力学法の結果は trans 構造からの相対値である。そのため、分子動力学法で計算された trans 構造での値を拡張 SPT での値にあわせて表示した。

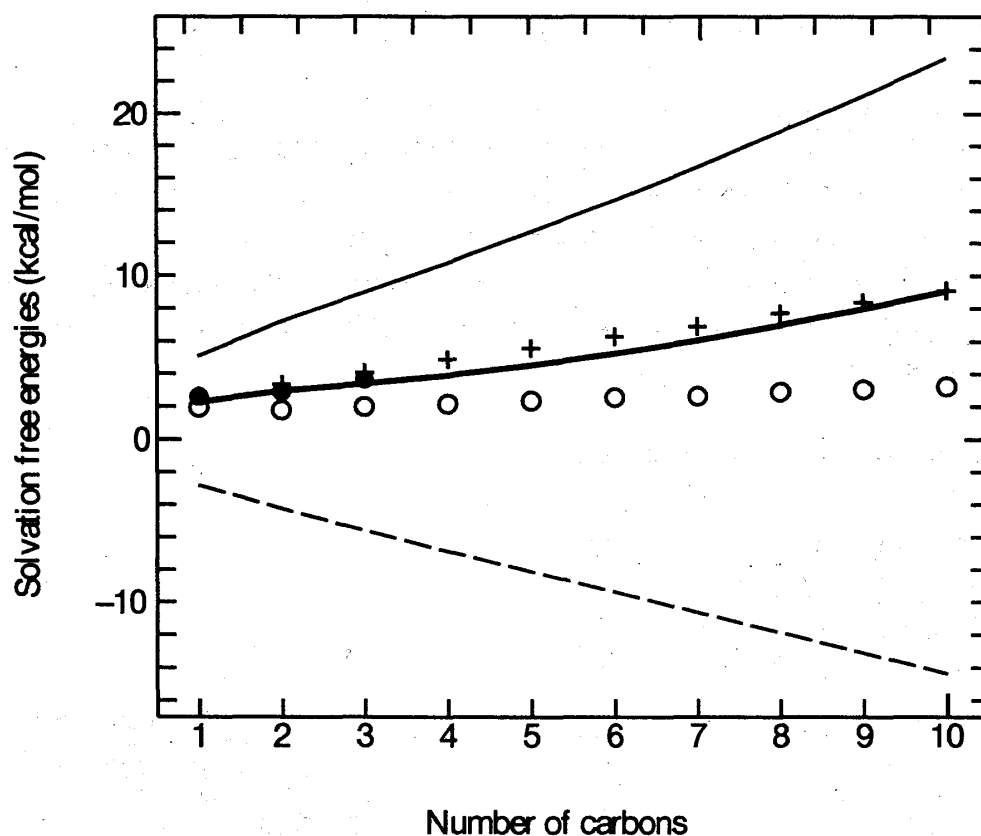


図7 炭素数に対して表示した、ノーマルアルカンの水和自由エネルギーの計算値。太い実線、細い実線、そして破線はそれぞれ、 $\bar{g}_h$ ,  $\bar{g}_c$  そして  $\bar{g}_l$  を示す。Sharp らの解釈による実験値、(●;  $v_v$  に部分モル体積を使った値、+;  $v_v$  にモラリティーを使った値) と、Sharp らの補正を行わない実験値 (O) を同時に示す。

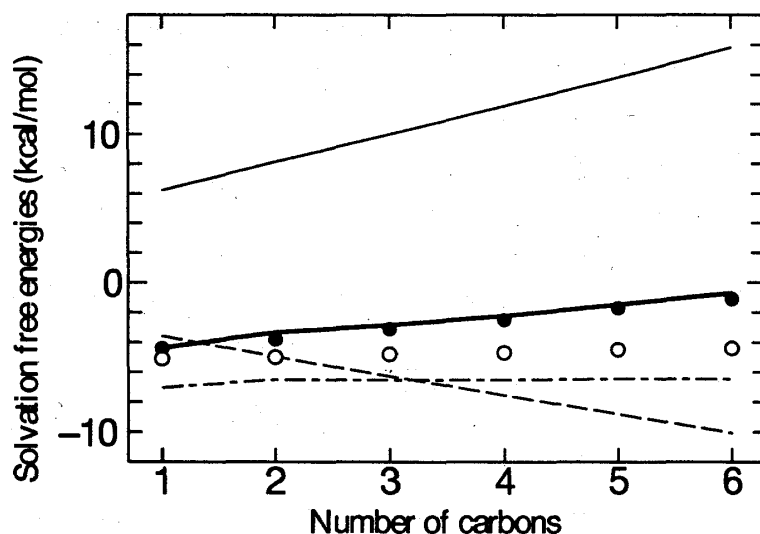


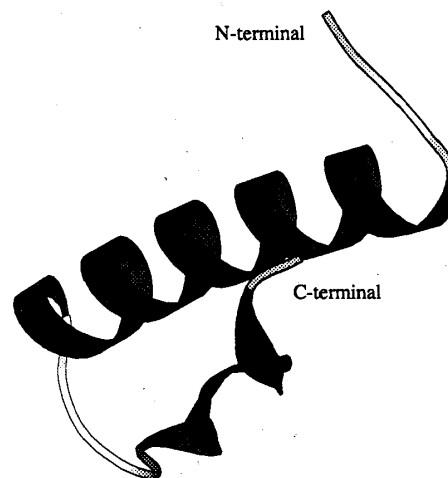
図8 炭素数に対して表示した、ノーマルアルコールの水和自由エネルギーの計算値。太い実線、細い実線、破線、そして一点鎖線はそれぞれ、 $\bar{g}_h$ ,  $\bar{g}_c$ ,  $\bar{g}_l$  そして  $\bar{g}_b$  を示す。Sharp らの解釈による実験値、(●;  $v_v$  に部分モル体積を使った値) と、Sharp らの補正を行わない実験値 (O) を同時に示す。

## ii. アルコールの水和自由エネルギー

ノーマルアルコールの水和自由エネルギーの値を、分子中の炭素数を横軸として図8に示す。ただし、分子の構造は trans 構造（分子中のすべての二面角の値が 180 度）にして計算した。実験値も同じ図に示す。拡張された scaled particle 理論で計算された値は、2つの実験値にとってもよく一致している。特に、Sharp の補正を行った実験値の方によくあっている。メタノールとエタノールについてのボルンエネルギーの値は、これまでに計算された他の方法での計算結果、分子動力学法を用いた自由エネルギー摂動法による計算 (-7.1 と -7.4) [20]や generalized Born equation による計算 (-7.1 と -6.4) [20]、とよく一致している。

## ii. Avian pancreatic polypeptide の水和自由エネルギー

Avian pancreatic polypeptide (PPT) は 36 残基のポリペプチド（小さな蛋白質）（図9）である。この PPT の水和自由エネルギーを計算した[30]。計算に用いた PPT の構造は、BNL の protein data bank の X線結晶構造 (1PPT)を用いた[31]。静電相互作用の計算を行うために、301 個の重原子を持つ結晶構造にヘテロ原子に結合している 67 個の水素原子を加えた。この構造では、N 末と C 末はそれぞれ正と負にイオン化している。また、3つのアルギニン残基が正にイオン化し、5つの残基が負にイオン化している。このポリペプチドの電荷の総和は -2 electron unit である。



Avian Pancreatic Polypeptide (36 residues)

図 9

このポリペプチドの露出表面積と排除体積はそれぞれ  $3336.8 \text{ \AA}^2$  と  $8524.1 \text{ \AA}^3$  である。2 個の  $\alpha$ -ヘリックス構造を持つにも関わらず、分子内のほとんどの重原子は水中に露出している（3 個の原子だけが露出していない）。

計算された水和自由エネルギーは、 $\bar{g}_C$ ,  $\bar{g}_I$ ,  $\bar{g}_B$  そして  $\bar{g}_H$  がそれぞれ、239.8 kcal/mol, -142.5 kcal/mol, -1612.4 kcal/mol そして -1515.1 kcal/mol である。

水和自由エネルギーの疎水水和の寄与の部分では、水の中に空洞を作るための仕事と、溶質と水の間に働く引力からの寄与がお互いに打ち消しあっている。親水水和の寄与であるボルンエネルギーは、親水的な残基が水中に露出しているため非常に大きな値を持つ。ここで計算されたボルンエネルギーについては塩濃度等も考慮したさらなる考察が必要であろう。

この蛋白質の天然状態（図10）での水和自由エネルギーの疎水水和からの寄与 ( $\bar{g}_C$  と  $\bar{g}_I$ ) の温度依存性を計算した。のびた構造（図11）での水和自由エネルギーの疎水水和からの寄与 ( $\bar{g}_C$  and  $\bar{g}_I$ ) の温度依存性も同様に計算した。ここで、のびた構造は変性した非天然状態としての蛋白



図10

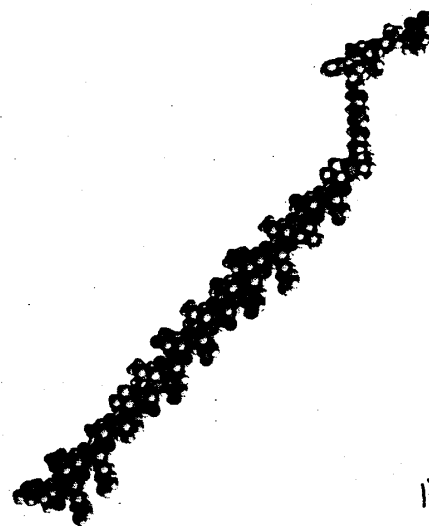


図11

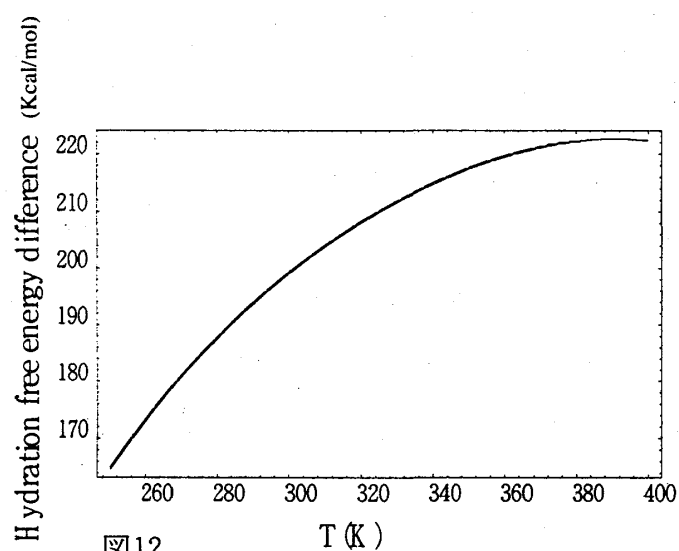


図12

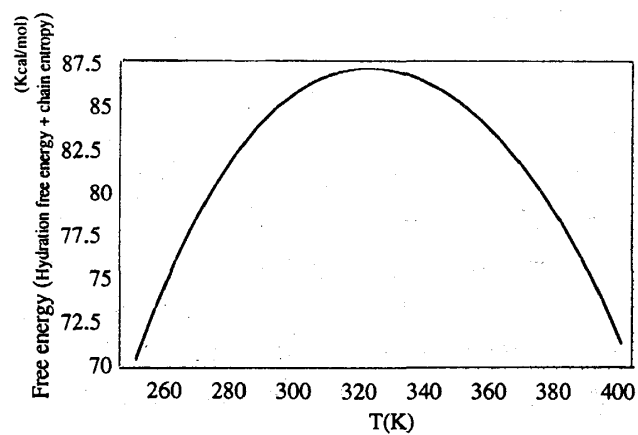


図13

質のモデルである。のびた構造では、PPT のすべての 2 面角を 180 度に設定した（ただし、固定されているプロリン残基の  $\phi$  は -75 度とした）。その際の構造のパラメータには Sheraga らの ECEPP の値を用いた。まず、天然状態での PPT の水和自由エネルギーの温度依存性を計算した。計算の結果、温度が上がると水和自由エネルギーの値が増加していることがわかった。次に非天然状態での PPT の水和自由エネルギーの温度依存性を計算した。天然状態での結果に比べて、温度依存性が強いことがわかった。また、100 度以上の温度ではあるが極大がみられた。溶質を入れたことにより水が持つ負のエントロピーが原因とする効果と、温度上昇による水の数密度の低下の効果の 2 つの効果から極大が形成される。また、引力項からの寄与である  $\bar{g}_i$  の温度依存性（我々の取り扱いでは水の数密度に比例する）は、 $\bar{g}_c$  に比べてとても小さい。しかし、溶質の構造の違いにより極大の位置がより低い温度に移動していた。図 1 2 は、非天然状態の水和自由エネルギーから生状態での水和自由エネルギーを引いたものである。この温度依存性から、水和が天然状態の蛋白質の低温での不安定要因になっていることがわかる。次に、非常に簡単な方法により、非天然状態の蛋白質の chain entropy を計算した。すべての 2 面角について 3 つの場合の数  $gauch^+$ ,  $gauch^t$ ,  $trans$  あるとした（ただし、ペプチド結合をなす  $\omega$  は除いた）。したがって、非天然状態の蛋白質の構造の数は、 $\omega$  を除く 2 面角の数を  $M$  とすると、3 の  $M$  乗になる。この chain entropy を図 1 2 の結果に加えたものが図 1 3 である。この図 1 3 は、天然状態から非天然状態への蛋白質の自由エネルギーの変化のうち、entropy の寄与を表していると解釈できる。非常に荒っぽい方法で chain entropy を計算しているにも関わらず、室温付近に極大を持つ結果が得られた。この結果は、低温では水和の効果が天然状態の不安定要因になり、高温では chain entropy が天然状態の不安定要因になることを示している。この結果は水和自由エネルギーの疎水水和からの寄与が、cold denaturation として知られている低温での変性の要因になりうることを示している。

今後、次の 2 点、1) 水和自由エネルギーの温度依存性のより正確な計算（静電相互作用の温度依存性の計算） 2) 非天然状態での構造の分布の温度依存性、について研究を進める必要がある。今回の水和自由エネルギー計算と従来からある立体構造エネルギーの計算を組み合わせることで、蛋白質の任意の構造の自由エネルギー計算が可能である。モンテカルロなどの方法[32]を用いて、蛋白質の自由エネルギーが最小になる立体構造である、蛋白質の天然状態での立体構造（3 次構造）をアミノ酸配列だけの情報（1 次構造）だけを元にして探す問題（3 次元構造予測）への応用が考えられる。

## 5. 結論

この拡張 SPT が蛋白質の水和を解析するための手法として有効だと思われる理由は、水分子の配位空間が膨大であることからくる問題を考慮しなくても良いことである。最も計算時間がかかる部分は溶質と溶媒の間の引力からくる寄与を数値積分するところである。排除体積の解析的計算で用いた手法を応用すれば、この項の解析計算も将来的には可能であると思われる。今回計算に用いた PPT での水和自由エネルギーではボルンエネルギーの寄与が支配的だったが、自由エネルギーの差を問題にするような場合は、疎水水和が重要になる。蛋白質の安定性の議論の場合、水和

自由エネルギーの温度依存性が問題になる。表面積を使った経験的手法をこのような問題に応用する場合、それぞれの温度でのパラメーターセットが必要になる。我々の手法の場合、水和自由エネルギーの温度依存性はほんの数個のパラメーターを変えることで計算できる。しかも、我々の手法は任意の形の分子の取り扱いえるので、水和自由エネルギーに対する溶質の形の影響を調べることも良い応用例の一つだと思われる。例えば、2つの蛋白質の接触面の構造変化は将来の良い課題であろう。

## 6. 付録

### 大きさの異なる球からなる重なった球の解析的な計算

重なった複数の球からなる立体図形は、Dodd の定義[33]によりそれぞれの球に属しているより小さな立体図形に分割することができる。分割された立体図形の体積  $V_a$  は次の式により計算できる。

$$V_c(\lambda) = \sum_a V_a(\lambda) \quad , \quad V_a = \frac{1}{3} R_a S_a^A + \sum_{LST2'(a)} \frac{1}{3} F_{ab} S_{ab}^I \quad , \quad F_{ab} = \frac{D_{ab}^2 + R_a^2 - R_b^2}{2D_{ab}} \quad , \quad (A1)$$

ここで  $a$  はすべての球についての通し番号である。  $LST2'(a)$  は球  $a$  上にある inaccessible surfaces を形作っている球についての通し番号である (see Fig. 4a),  $S_a^A$  と  $S_{ab}^I$  は球  $a$  上にある accessible surface と inaccessible surface の面積である,  $R_a$  は球  $a$  の半径, そして  $D_{ab}$  球  $a$  と球  $b$  の中心間の距離である。それぞれの球に属する立体図形は、体積計算で重要となるトポロジーに関する要素である intersection circles, exposed vertices, buried vertices をもっている (図 A-1). 式 (A1) はそれぞれの球に属する立体図形が cone-pyramids や spherical sectors といったより小さな立体図形に分割できることを示している (図 A-2).

球の半径と各球間の距離だけの関数としての、 $V_a$  の解析的な式が我々によって得られている[35]。式 (A-1) から出発してそれぞれの項のもつトポロジーに注意を払い整理すると、最終的には、エレガントな式になる。 $V_a$  を計算するために必要なトポロジー<sup>3</sup>は以下の通りである

<sup>3</sup> このようにトポロジーが重要であるのは、球面の面積を位相微分幾何学のガウス・ボンネの定理を用いて計算することに起因する [F-2]。

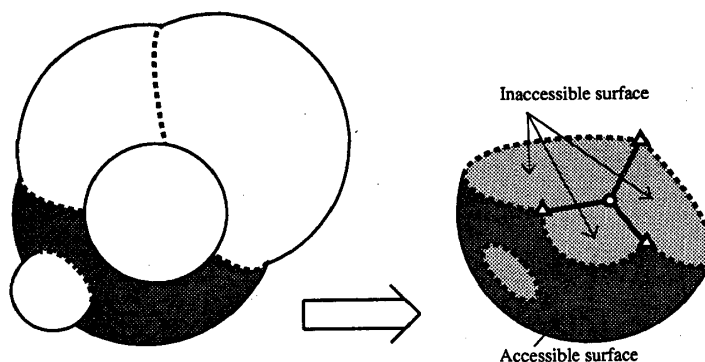


Fig. A-1 Accessible and inaccessible surface of a component of fused spheres. The thick dashed line represents intersection circles (including one isolated intersection circle). The symbols  $\bigcirc$  and  $\triangle$  show the locations of the exposed and buried vertices respectively.

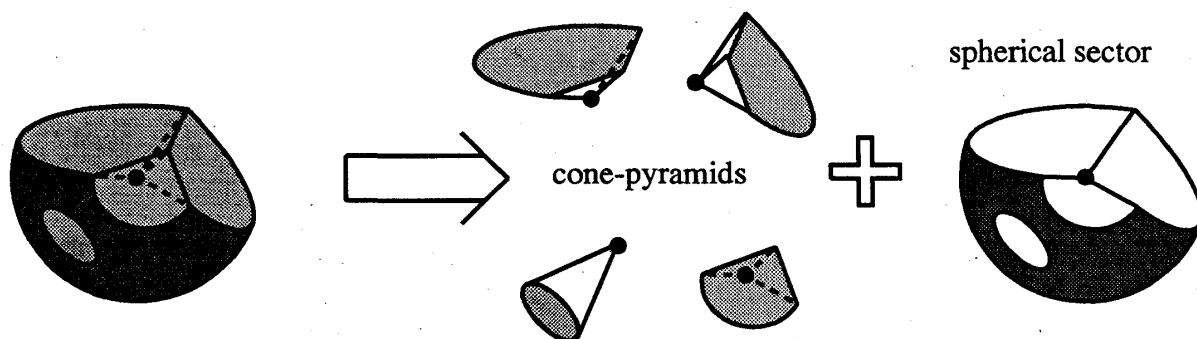


Fig. A-2 Cone-pyramids and spherical sectors. The symbol  $\bullet$  shows the location of the center of the sphere (for the case of the left body, the center of the sphere is located inside the body).

- 0) 球  $a$  の accessible surface のオイラー数  $\kappa_a$
- 1) 注目している球  $a$  が孤立している ( $4/3 \pi R_a^3$  の体積を持つ) か、そうでないか。
- 2) 球  $a$  上の intersecting circle を作っている球のリスト、LST2(a) .
- 3) 球  $a$  上の exposed vertex を作っている 2 球のリスト LST3(a).
- 4) 球  $a$  上の buried vertex を作っている 3 球のリスト LST4(a)

体積  $V_a$  は任意の形の場合について次の式で計算できる。:



$$V_a = T_1(a) + \sum_{LST2(a)} T_2(a, b) + \sum_{LST3(a)} \{T_{3a}(a, b, c) + T_{3b}(a, b, c) + T_{3b}(a, c, b)\} \\ + \sum_{LST4(a)} \{T_4(a, b, c, d) + T_4(a, c, d, b) + T_4(a, d, b, c)\} \quad , \quad (A2)$$

$$T_1(a) = \frac{2}{3} \pi R_a^3 \chi_a^A \quad , \quad T_2(a, b) = \frac{2}{3} \pi R_a^2 F_{ab} + \frac{1}{3} \pi F_{ab} J_{ab}^2 \quad ,$$

$$T_{3a}(a, b, c) = \frac{1}{3} R_a^3 \Omega(a, b, c) \quad ,$$

$$T_{3b}(a, b, c) = -\frac{1}{3} R_a^2 F_{ab} \Phi(a, b, c) \\ + \frac{1}{6} F_{ab} [-J_{ab}^2 \Phi(a, b, c) + L(a, b, c) \{J_{ab}^2 - L(a, b, c)^2\}^{1/2}] \quad ,$$

$$T_4(a, b, c, d) = -\frac{1}{3} R_a^2 F_{ab} \Psi(a, b, c, d) + \frac{1}{6} F_{ab} [-J_{ab}^2 \Psi(a, b, c, d) + M(a, b, c, d)] \quad ,$$

$$F_{ab} = \frac{D_{ab}^2 + R_a^2 - R_b^2}{2D_{ab}} \quad , \quad J_{ab} = \{R_a^2 - F_{ab}^2\}^{1/2} \quad , \quad L(a, b, c) = \frac{-F_{ab} \cos \theta_{abc} + F_{ac}}{\sin \theta_{abc}} \quad ,$$

$$M(a, b, c, d) = \frac{2L(a, b, c)L(a, b, d) - (L(a, b, c)^2 + L(a, b, d)^2) \cos \Psi(a, b, c, d)}{\sin \Psi(a, b, c, d)}$$

$$\Omega(a, b, c) = -\cos^{-1} \left( \frac{R_a^2 \cos \theta_{abc} - F_{ab} F_{ac}}{J_{ab} J_{ac}} \right) \quad , \quad \Phi(a, b, c) = \cos^{-1} \left( \frac{L(a, b, c)}{J_{ab}} \right) \quad ,$$

$$\cos \theta_{abc} = \frac{D_{ab}^2 + D_{ac}^2 - D_{bc}^2}{2D_{ab} D_{ac}} \quad , \quad \sin \theta_{abc} = \{1 - \cos^2 \theta_{abc}\}^{1/2} \quad ,$$

$$\cos \Psi(a, b, c, d) = \frac{D_{ac}^2 \sin^2 \theta_{abc} + D_{ad}^2 \sin^2 \theta_{abd} - D_{cd}^2 + (D_{ad} \cos \theta_{abc} - D_{ac} \cos \theta_{abd})^2}{2D_{ac} D_{ad} \sin \theta_{abc} \sin \theta_{abd}} \quad ,$$

$$\sin \Psi(a, b, c, d) = \{1 - \cos^2 \Psi(a, b, c, d)\}^{1/2} \quad ,$$

排除体積が原子の半径と原子間の距離のみの関数になっているため、排除体積のスケーリングパラメーターに関する1次と2次の微分が式(A2)を使って解析的に求められる。

## 7. 謝辞

この文章にある、Scaled particle 理論の拡張とその応用は、東大の高橋卓也氏、分子科学研究所の平田文男教授、東大の永山国昭教授、ならびに阪大の柳田敏雄教授との共同研究で行われました。この場を借りて御礼を申し上げます。

## 8. references

- 1 Anfinsen, C.B. and Scheraga, H.A., *Adv. Prot. Chem.*, **29**, 205 (1975)
- 2 Ooi, T., and Oobatake, M., *J. Biochem.*, **103**, 114 (1988)

- 3 Ooi, T., Oobatake, M., Némethy, and G., Sheraga, H.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3086 (1987)
- 4 Irisa, M., Nagayama, K., and Hirata, F., *Chem. Phys. Letters*, **207**, 430 (1993)
- 5 Irisa, M., Takahashi, T., Nagayama, K., and Hirata, F., *Molecular Physics*, **85**, 1227 (1995)
- 6 Hansen, J.-P. and McDonald, I.R., "Theory of simple liquids", Academic press, Harcourt Brace Jovanovich, Publishers
- 7 Reiss, H., Fish, H.L., and Lebowitz, J.L., *J. Chem. Phys.*, **31**, 369 (1959)
- 8 Pierotti, R.A., *Chem. Rev.*, **76**, 717 (1965).
- 9 Soda, K., *J. Phys. Soc. Jpn.*, **62**, 1782 (1993)
- 10 Pierotti, R.A., *J. Phys. Chem.*, **69**, 281 (1965)
- 11 Gibbons, R.M., *Mol. Phys.*, **17**, 81 (1969).
- 12 Boublík, T., *Mol. Phys.*, **27**, 1415 (1974)
- 13 Boublík, T., *Mol. Phys.*, **44**, 1369 (1981)
- 14 Pierotti, R.A., *J. Phys. Chem.*, **67**, 1840 (1963)
- 15 Tanford, C, and Kirkwood, J.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5333 (1957)
- 16 Rogers, N.K., *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **48**, 37 (1986)
- 17 Warwicker, J. and Watoson, H.C, *J. Mol. Biol.*, **157**, 671 (1982)
- 18 Nakamura, H., *J. Phys. Soc. Jpn.*, **57**, 3702 (1988)
- 19 Takahashi, T., Nakamura, H., and Wada, A., *Biopolymers*, **32**, 897 (1992)
- 20 Still, W.C., Tempczyk, A., Hawley, R.C., and Hendrickson, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6127 (1990)
- 21 Jorgensen, W.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 335 (1981)
- 22 Jorgensen, W.L. and T-Rives, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1657 (1988)
- 23 Richards, F.M., *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **6**, 151. (1977)
- 24 Boublík, T., *Adv. Chem. Ser.*, **204**, 173 (1983)
- 25 Jorgensen, W.L. and Buckner, J.K., *J. Phys. Chem.* **91**, 6083 (1987)
- 26 Sharp, K.A., Nicholls, A., Friedman, R., and Honig, B., *Biochemistry*, **30**, 9686 (1991)
- 27 Sharp, K.A., Nicholls, A., Fine, R.M., and Honig, B., *Science*, **252**, 106 (1991)
- 28 Flory, P.J., *J. Chem. Phys.*, **9**, 660 (1941)
- 29 Huggins, M.L., *J. Chem. Phys.*, **9**, 440. (1941)
- 30 Masayuki Irisa, Takuya Takahashi, Fumio Hirata, and Toshio Yanagida, *Journal of Molecular Liquids*, **65/66**, 381-384 (1995)
- 31 Blundell, T.L., Pitts, J.E., Tickle, I.J., Wood, S.P., Wu, C.-W., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**, 4175 (1981)
- 32 Hansmann, U. and Okamoto, Y., *J. Comp. Chem.* **14**, 1333 (1993)

- 33        Dodd, L.R., and Theodorou, D.N., *Mol. Phys.*, **72**, 1313 (1991)
- 34        Irisa, M., *Comp. Phys. Comm.*, in press
- F-1       木原太郎, "分子間力", 岩波全書, 岩波書店
- F-2       Richmond, T.J., *J. Mol. Biol.*, **178**, 63 (1984)